

细菌 16S rRNA 基因芯片的构建及其在细菌鉴定中的应用

Construction of 16S rRNA gene chip and its application in bacterium identification

薛建亚¹, 翁心华², 朱利平², 万漠彬^{1*}

(1. 第二军医大学长海医院感染科, 上海 200433; 2. 复旦大学附属华山医院感染科, 上海 200040)

[摘要] **目的:** 构建细菌 16S rRNA 基因芯片, 并将其应用于细菌检测。**方法:** 根据细菌 16S rRNA 基因保守区设计合成针对革兰阳性细菌、革兰阴性细菌的通用探针, 以及针对肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的特异性探针, 并构建基因芯片。利用所构建的芯片检测相应细菌, 并观察其特异性及敏感性。**结果:** 成功构建了相应的基因芯片; 所构建的基因芯片能准确检出相应细菌, 无交叉阳性现象, 检测时间约需 6 h; 所构建的基因芯片能检测出 DNA 含量为 15 fg 的大肠埃希菌基因组 DNA。**结论:** 细菌 16S rRNA 基因芯片可用于细菌的检测, 具有良好的特异性及敏感性, 且耗时少。

[关键词] RNA, 核糖体, 16S; 基因芯片; 细菌

[中图分类号] R 372 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0919-03

细菌核糖体 RNA(rRNA)是细菌生命的标志, 其 16S rRNA 基因是以多拷贝形式存在于所有细菌染色体基因中。目前对细菌 16S rRNA 基因区的研究较多, 特别是将其应用于细菌的检测^[1-2]。国外 20 世纪 90 年代初即有关于利用细菌 16S rRNA 基因结构特点构建基因芯片, 并将其应用于细菌鉴定的报道, 但国内应用较少。本研究利用 16S rRNA 保守区的高度保守性, 探索构建用于细菌检测的基因芯片的可行性及方法, 为构建临床上检测耐药菌株所需的基因芯片奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要菌株 标准菌株来自第二军医大学长海医院实验诊断科及上海市疾病控制中心。菌株包括肺炎克雷伯菌, 表皮葡萄球菌, 奇异变形杆菌, 普通变形杆菌, 福氏志贺菌, 宋内志贺菌, 粪肠球菌, 无乳链球菌, 金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌, 铜绿假单胞菌, 尿肠球菌, 肺炎链球菌, 溶血性链球菌。

1.2 主要试剂与仪器 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司(大连)。引物及探针由上海生工生物工程技术有限公司(PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪)合成并纯化。PCR 扩增仪为 HBRE02 HL110(ThermoHybaid)。

1.3 基因芯片的制备

1.3.1 标本 DNA 抽提 菌株 DNA 制备采用经典酚-氯仿法^[3](在细菌溶解时溶菌酶作用时间依不同细菌略作调整)。

1.3.2 引物、探针的合成及 16S rRNA 基因 PCR 扩增 引物的设计与合成参考文献^[4], 选自细菌 16S rRNA 基因保守区, 引物合成后在引物 1 的 5'端加荧光标志 CY5。设计 2 条分别针对革兰阳性及革兰阴性细菌的寡核酸探针, 同时设计针对肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的特异探针。PCR 的反应液组成(反应体系共 50 μl): 10×PCR Buffer 5 μl, dNTP(mixture) 4 μl, 引物各 0.5 μl, Taq 酶 0.25 μl, 模板 1 μl, ddH₂O 38.75 μl。循环 94℃, 30 s; 55℃, 30 s; 74℃, 3 min; 共 30 个循环。

1.3.3 16S rRNA 基因引物特异性、敏感性检测 以 16S rRNA 基因引物对乙型肝炎病毒 DNA、人血白细胞 DNA 及大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、耳葡萄球菌、流感嗜血杆菌等细菌 DNA 进行 PCR 扩增, 其扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察其特异性。将大肠埃希菌 DNA 按其浓度进行 1:10 梯度稀释, 以 16S rRNA 基因引物进行 PCR 反应, 将 PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察其敏感性。

1.3.4 点样及制片 用 25% NaOH 溶液 200 ml 加 95% 乙醇至 500 ml 配成碱性清洗液。将载玻片浸泡过夜, 再用清水冲洗。将洗净的载玻片用多聚-L-赖氨酸浸泡液浸泡 1 h 后取出, 清洗, 干燥。将探针稀释成一个较合适的浓度用 GMS417 点样仪点样, 点样后再水合化及快速干燥、UV-交联、封闭及变性。

1.4 反相杂交鉴定细菌 将 PCR 产物滴在基因芯片的中央, 滴好后在载玻片 DNA 阵列部位上方放一盖玻片, 并在其周围滴上 3×SSC 溶液以保持杂交池中的湿度。再将载玻片用塑料膜包起来置于 65℃ 水溶液中杂交 4~16 h。杂交完成后要进行清洗, 整个清洗过程都在室温下进行。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因引物的特异性 用 PCR 方法进行扩增实验用细菌, 经电泳在相当于 371 bp 处均可见 1 条 DNA 条带, 而同期采用的人血白细胞 DNA 及乙型肝炎病毒 DNA 扩增未见阳性条带(图 1)。

2.2 16S rRNA 基因引物的敏感性 取大肠埃希菌的 DNA, 以 1:10 进行定量稀释, 再以各稀释组进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行电泳, 结果所示最低限能测出模板 10⁻⁷ 稀释度的扩增产物(图 2), 该泳道大肠埃希菌 DNA 浓度约为 1 pg, 即相当于可检测出 DNA 含量为 15 fg 的大肠埃希菌基因组 DNA。

[作者简介] 薛建亚, 博士, 主治医师. E-mail: jyxue@163.com
* Corresponding author. E-mail: mobinwan@yahoo.com.cn

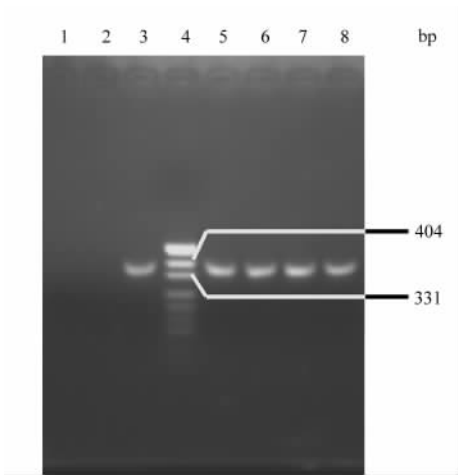


图 1 16S rRNA 基因引物的特异性

1:乙型肝炎病毒 DNA; 2:人血白细胞 DNA; 3:大肠埃希菌 DNA; 4:DNA marker; 5:金黄色葡萄球菌 DNA; 6:肺炎链球菌 DNA; 7:耳葡萄球菌 DNA; 8:流感嗜血杆菌 DNA

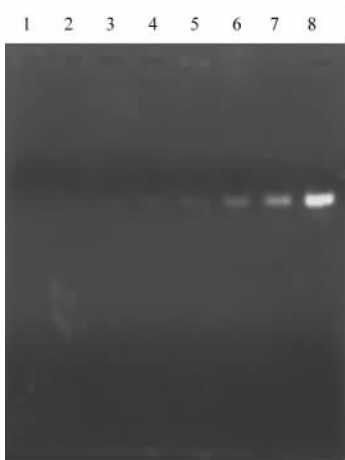


图 2 16S rRNA 基因引物的敏感性

1~8 泳道的模板稀释度分别为 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}

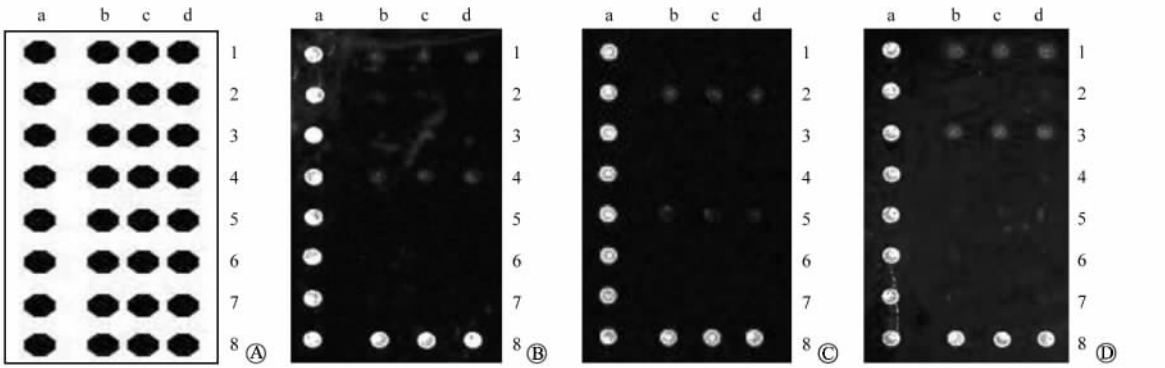


图 3 16S rRNA 基因芯片鉴定细菌结果

a 列为定位点, b、c、d 为杂交位点; 1、2 分别为 G^{+} 、 G^{-} 菌通用探针; 3、4、5 分别为肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌特异探针; 6、7、8 分别为阴性 1、阴性 2 及阳性内参照点. A: 基因芯片杂交示意图; B: 金葡萄杂交结果; C: 大肠埃希菌杂交结果; D: 肺炎链球菌杂交结果

2.3 基因芯片鉴定细菌结果 利用所构建的基因芯片对实验所用的标准菌株的 PCR 产物进行检测, 本芯片能准确区分出实验菌株是革兰阳性菌或是革兰阴性菌株, 且金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及肺炎链球菌在芯片中相对应的位点也能准确显示, 提示其能正确检测出相应细菌(图 3)。

3 讨论

细菌核糖体 RNA 是细菌生命的标志, 保守性极强, 某些序列片段为所有细菌共有, 因此有人将其称为细菌的“化石”。一般认为, 对于同一种细菌其基因组的同源性应大于 70%^[5]。对 16S rRNA 而言, 如果出现 3 个以上碱基差异就可断定细菌不属于同一种属。因此, 从理论上讲可以设计出针对所有细菌共同的 PCR 反应引物。本研究参考 Greisen 等^[4]的报道, 设计了针对所有细菌 16S rRNA 基因的共同引物, 经 PCR 扩增均可见到 1 条 371 bp 的电泳条带, 而同时进行 PCR 反应的人血白细胞 DNA 及乙型肝炎病毒 DNA, 均未出现阳性条带。这提示该引物对细菌具有较高的特异性。

基因芯片技术具有多样品并行处理能力、分析速度快、所需样品量少、污染小等优点^[6]。国外 20 世纪 90 年代初即有关于利用细菌 16S rRNA 基因结构特点构建基因芯片, 并将其应用于细菌鉴定的报道, 但国内应用较少。本实验参考前人研究^[4], 结合细菌 16S rRNA 基因的结构特点, 设计了针对该基因序列的革兰阳性菌及革兰阴性菌通用探针, 并对 PCR 反应、杂交条件等进行优化处理, 成功制备了细菌 16S rRNA 基因特异性的基因芯片, 将其应用于检测实验中所选用的 14 株革兰阳性及阴性菌, 均可准确检出, 且未出现交叉阳性现象。这表明这两种探针具有较高的特异性, 与文献^[5,7]报道一致。本研究设计的针对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及肺炎链球菌的特异性探针, 在检测过程中均能正确识别相应菌株, 未发现假阳性或假阴性现象。以上结果表明将本实验所设计的基因芯片用于鉴定细菌具有很高的特异性及敏感性。另外, 本实验所需时间相对传统的细菌培养方法明显要少, 从菌株 DNA 的提取到检测芯片的判读约需

6 h^[5],而传统细菌培养方法至少需要 24 h。因此,构建这类细菌诊断的基因芯片,不仅能在较短的时间明确细菌的存在与否,同时还可初步判断细菌属革兰阳性或革兰阴性,为临床对感染性疾病的诊断^[8],特别是那些存在细菌感染而早期临床表现不明显的疾病如自发性细菌性腹膜炎^[9]等的早期诊断提供了依据,有利于抗生素的合理使用,避免了临床抗生素的滥用。

本研究成功构建了细菌 16S rRNA 基因芯片,应用于细菌鉴定取得较好效果,相信随着特异性探针数量的增多,其对更多的样本或混合感染的样本进行检测的能力也将越来越高,检测时间会越来越短,这将为临床细菌的诊断提供一种全新、快速、灵敏的方法。

[参 考 文 献]

[1] Behr T, Koob C, Schedl M, et al. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization[J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23: 563-572.

[2] Turenne C Y, Witwicki E, Hoban D J, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 513-520.

[3] 朱利平,石尧忠,陈一平,等. 建立检测嗜肺军团菌 mip 基因的

PCR 微孔板反向探针杂交法[J]. 上海医科大学学报, 1999, 26: 60-61.

[4] Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 335-351.

[5] Trotha R, Hanck T, Konig W, et al. Rapid ribosequencing—an effective diagnostic tool for detecting microbial infection[J]. Infection, 2001, 29: 12-16.

[6] 赵雨杰,孙 啸,何农跃,等. 基因芯片在医学中的应用[J]. 临床检验杂志, 2000, 18: 373-375.

[7] Lu J J, Perng C L, Lee S Y, et al. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 2076-2080.

[8] Marques-da-Silva R, Caugant D A, Eribe E R, et al. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis[J]. J Vasc Surg, 2006, 44: 1055-1060.

[9] 薛建亚,李成忠,张 迁,等. 重型病毒性肝炎并发院内自发性细菌性腹膜炎的临床分析[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 1023-1025.

[收稿日期] 2007-03-16 [修回日期] 2007-07-02
[本文编辑] 贾泽军